家蚕蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征

钟仰进[1,2]，曾 林[1,2]，黄志君[1]，刘吉平[1]，邓小娟[1]，杨婉莹[1]，曹 阳[1,2*]，顾世红[3]

(1. 华南农业大学蚕学分子生物学与生物技术实验室，广州 510642； 2. 西南农业大学农业部蚕桑学重点实验室，重庆 400716；
3. 台湾自然科学博物馆动物学组，台湾台中 40419)

摘要：利用形态学观察方法、分子生物学检测方法以及20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone)和放线菌酮(cycloheximide)体外培养方法，研究了家蚕 *Bombyx mori* 蛹变态期丝腺组织的退化与细胞凋亡特征。显微镜的观察显示家蚕丝腺的逐渐退化发生在吐丝期间。DNA梯度电泳的分析表明程序性细胞死亡(programmed cell death)可能伴随发生在丝腺的退化过程中。在离体培养条件下，用20-羟基蜕皮酮处理5龄第6天幼虫的丝腺，导致的细胞凋亡提前于对照，提示在进入蛹变态期前，20-羟基蜕皮酮提早激发了介导家蚕丝腺细胞凋亡与水解机制的遗传调控级联系统。上述结果表明，20-羟基蜕皮酮能够诱导家蚕丝腺组织在蛹变态期发生程序性细胞死亡。

关键词：家蚕；变态；细胞凋亡；程序性细胞死亡；20-羟基蜕皮酮

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2005)03-0319-06

Characteristics of degeneration and apoptosis of silk gland during the larval-pupal metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHONG Yang-Jin[1,2], ZENG Lin[1,2], HUANG Zhi-Jun[1], LIU Ji-Ping[1], DENG Xiao-Juan[1], YANG Wan-Ying[1], CAO Yang[1,2*], GU Shi-Hong[3] (1. Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China; 3. Department of Zoology, National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan 40419, China)

Abstract: The characteristics of degeneration and apoptosis of silk glands, during the larval-pupal metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori* were studied by the general morphological observation, the molecular methods, and *in vitro* cultivation with 20-hydroxyecdysone and cycloheximide. The microscopic observation showed that silk gland degeneration gradually occurred during the spinning period. Analysis using DNA ladder electrophoresis indicated that programmed cell death might be involved in gland degeneration. *In vitro* incubation of silk glands from larvae of day 6 of the last instar with 20-hydroxyecdysone showed an accelerated apoptosis as compared with those in controls, indicating that the pulses of 20-hydroxyecdysone before larval-pupal metamorphosis trigger genetic regulatory hierarchies that mediate apoptosis and hydrolysis. From these results, it was concluded that molting hormone 20-hydroxyecdysone could turn on programmed cell death of the silk gland during larval-pupal metamorphosis.

Key words: *Bombyx mori*; metamorphosis; apoptosis; programmed cell death; 20-hydroxyecdysone

在家蚕 *Bombyx mori* 的蛹变态期(即家蚕幼虫吐丝完毕至成虫羽化阶段，由幼虫-蛹变态期和蛹-蛾变态期组成)，由于蜕皮激素(molting hormone)的信号启动，虫体内发生着激烈的新旧组织的替换：幼虫专性组织如前胸腺、丝腺等迅速退化消亡；成虫盘组织如翅芽、腿芽、生殖腺细胞等迅速增殖生长。对于家蚕等全变态昆虫在蛹期的这两大类组织呈现完全不同发育走向的研究，过去一直停留在传统的定性描述上，认为幼虫专性组织的消亡主要是在内分泌系统激素诱导下，触发水解酶类活性引起组织消解的结果(张红卫等，2001)。

许多动物在变态发育中，幼体器官的缩小和退

基金项目：国家"863"计划(2004AA2Z1020)；国家自然科学基金项目(30370716)
作者简介：钟仰进，男，1962年2月生，硕士，副教授，研究方向为昆虫生理学与细胞生物学，E-mail：zhongyj@scau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：caoyang@scau.edu.cn
收稿日期 Received：2004-09-14；接受日期 Accepted：2005-01-24

化通常伴有程序性细胞死亡(programmed cell death),即细胞凋亡(apoptosis)的过程。Dai 和 Gilbert(1997,1999)由烟草天蛾 *Manduca sexta* 变态期前胸腺组织第一次观察到了体内自然发生的细胞凋亡小体(apoptotic body)和血细胞对凋亡小体的吞噬过程,并以末端标记(terminal deoxylnucleotidyl transferase mediated-dUTP nick end labeling,TUNEL)法、DNA 梯度(DNA laddering)电泳的实验结果加以证实,同时对体外培养的前胸腺获得了 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone)诱导的凋亡小体和 DNA 梯度的电泳谱。Ress 等(2000)则用 20-羟基蜕皮酮对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 卵巢细胞株系诱导获得了凋亡小体和得到 TUNEL 实验证据。Terashima 等(2000)和 Tsuzuki 等(2001)分别用 20-羟基蜕皮酮诱导体外培养的家蚕 5 龄 6~7 天丝腺细胞,得到 DNA 梯度电泳结果,并克隆到与凋亡有关的 8 个基因新序列(*ec*01-08)。但是,关于家蚕蛹变态期幼虫专性组织自然发生细胞凋亡的生物学特征和获取分子生物学实验证据的研究至今未见报道。

我们参考 Tsuzuki 等(2001)体外诱导细胞凋亡的方法,对家蚕蛹变态期自发的和诱导的细胞凋亡特征进行研究,希望能够对家蚕变态发育期细胞凋亡发生的遗传调控研究提供参考。

1 材料与方法

供试家蚕品种为九·芙,由广东省蚕业研究所提供 5 龄幼虫,于广东省秋季 10 月中下旬在本实验室白天 28℃左右的自然室温(无温控条件,昼夜温差约 6~8℃)下小量饲养。取材为 5 龄第 6 天的幼虫(即 5 龄后期的熟蚕)至化蛹第 2 天的蚕蛹(化蛹第 3 天的丝腺组织已完全消亡)。对 5 龄第 6 天至吐丝第 1 天(即 5 龄第 9 天)的幼虫每隔 24 h、吐丝第 2 天(5 龄第 10 天)的幼虫至化蛹第 2 天的蚕蛹每隔 2 h,由虫体解剖取出丝腺组织,按常规方法进行石蜡切片,苏木精染色后供光学显微镜和按常规方法进行透射电镜观察(路名芝等,1998;潘耀谦等,2001)。同时将取出的丝腺组织立即按 Sambrook 等(1992)方法提取 DNA 和进行 DNA 电泳检测,观察家蚕蛹变态期丝腺组织体内条件下自发的细胞凋亡特征。

将从 5 龄第 6 天幼虫取出的一对丝腺组织放入 Greece 培养基(培养皿 Φ6 cm)中培养。Greece 培养基分 4 组:第 1 组只加入 20-羟基蜕皮酮(Sigma 公司产品),终浓度为 0.5 μg/mL;第 2 组加入终浓度为 0.5 μg/mL 的 20-羟基蜕皮酮和终浓度为 10 mg/mL 的放线菌酮(cycloheximide)(Sigma 公司产品);第 3 组只加入终浓度为 10 mg/mL 的放线菌酮;第 4 组为空白对照,不加 20-羟基蜕皮酮和放线菌酮。每组重复 3 次。于 25~28℃培养 48 h 后取出丝腺组织,按上述相同方法提取 DNA 及进行 DNA 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 丝腺组织发生细胞凋亡的形态学特征

首先观察家蚕丝腺组织外部形态的变化。在本实验的饲养条件下,供试家蚕幼虫结束吐丝前的丝腺组织体腔巨大,吐丝完毕后,丝腺组织逐渐萎缩,到化蛹第 2 天丝腺组织已萎缩至很小,第 3 天则完全消失(图 1)。利用光学显微镜观察发现,吐丝第 1、2 天的丝腺细胞开始出现皱褶,至化蛹第 1 天皱褶已很明显,这与凋亡细胞的外部形态特征相吻合(彭黎明和王曾礼,2000),显示家蚕丝腺组织的退化发生在吐丝期间,但未见典型的凋亡小体(图 2:a~d)。对不同时期的丝腺组织同时进行透射电镜观察,结果与光学显微镜的观察相同,至化蛹第 2 天丝腺细胞皱褶已非常显著(图 2:e~f),同时在丝腺组织腺腔内膜与外膜包被的呈分枝状的丝腺细胞皱褶附近,发现有许多大小不等的圆球形小体(图 2:g),有的小体发生解裂,"吐出"的圆形颗粒边缘模糊,似呈逐渐消解的状态(图 2:h~i)。这些圆球形小体与在烟草天蛾前胸腺观察到的凋亡小体特征以及它们逐渐消解的状态非常相似(Dai and Gilbert,1997,1999)。据此推测在家蚕丝腺细胞腔内发现的这些圆球小体就是凋亡小体。

2.2 丝腺组织发生细胞凋亡的 DNA 电泳检测

从不同时期的丝腺组织中提取 DNA,进行常规 DNA 电泳检测。发现在丝腺组织显著萎缩变化的化蛹第 2 天时期,出现了凋亡细胞所特有的 DNA 梯度电泳谱特征(图 3:7),而在其他时序的丝腺组织的 DNA 电泳呈涂抹拖尾(图 3:1~6)。表明在丝腺组织逐渐萎缩退化的过程中,细胞凋亡滞后发生,直至大部分细胞进入凋亡程序后才能检测到 DNA 梯度电泳谱,此时已可观察到大量发生的圆球形小体(凋亡小体)。由此首次证实家蚕在蛹变态期丝腺组织的退化过程中伴随有逐渐发生的细胞凋亡。

2.3 体外诱导和抑制的细胞凋亡

从家蚕幼虫 5 龄第 6 天取出丝腺,采用 Greece 培养基,分别按照不同组合加入 20-羟基蜕皮酮或放

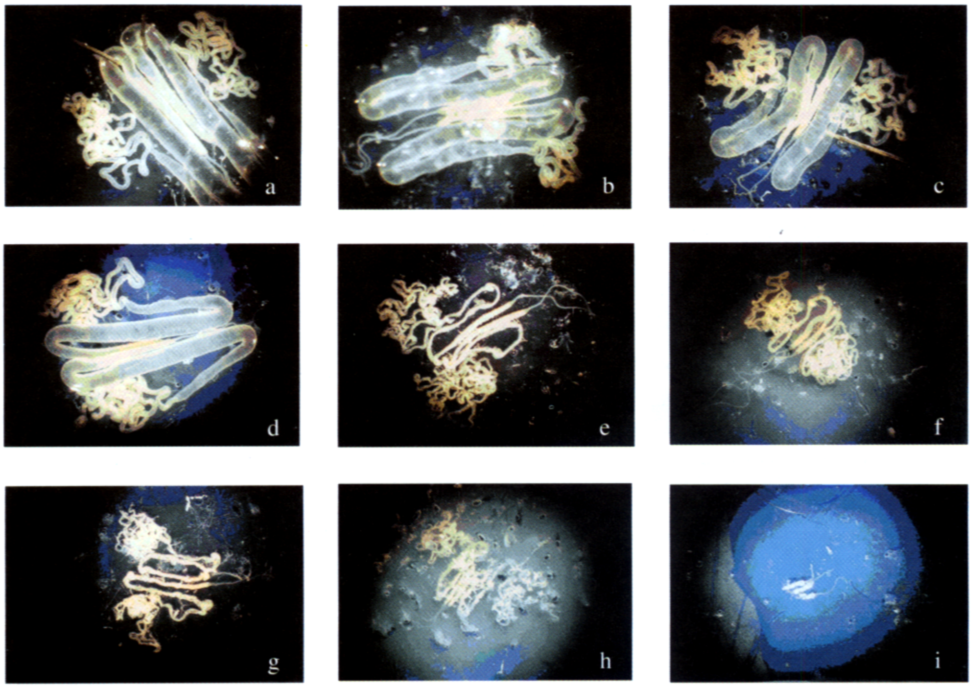


图 1　家蚕 5 龄第 7 天幼虫至化蛹第 2 天丝腺组织的外部形态观察(1.5×)

Fig. 1　The exterior morphologies of silk glands of silkworm during day 7 of the last instar larvae to the 2nd day of pupation (1.5×)

a～c：分别为 5 龄第 7 天、8 天和吐丝第 1 天幼虫的丝腺 The silk glands on day 7 and day 8 of the last instar larvae, and the 1st day of spinning larvae, respectively; d～f：分别为吐丝第 2 天幼虫早、中、晚的丝腺 The silk glands in the morning, midnoon and afternoon of the 2nd day of spinning larvae, respectively; g～i：分别为化蛹第 1 天中、晚和化蛹第 2 天的丝腺 The silk glands in the midnoon, afternoon of the 1st day after pupation, and on the 2nd day after pupation, respectively.

线菌酮,进行丝腺组织体外培养的细胞凋亡诱导和抑制的时序性变化观察。培养 48 h 后,即相当于 5 龄幼虫第 8 天的时间,对比于体外培养的空白对照(图 4：1),在只含有 20-羟基蜕皮酮(终浓度 0.5 μg/mL)的培养基中检测到 DNA 梯度电泳谱(图 4：4),相对于在化蛹第 2 天体内检测到 DNA 梯度电泳谱的时间(图 3：7)提前了 3 天。在含有细胞凋亡抑制剂放线菌酮(终浓度 10 mg/mL)的 2 组培养基中,于同样时间内未检测到 DNA 梯度电泳谱(图 4：1～3)。由此表明在对蛹变态期前的丝腺组织进行离体培养的条件下,昆虫蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮提早激发了介导家蚕丝腺细胞凋亡与水解机制的遗传调控级联系统。

3　讨论

以家蚕为实验对象,探讨昆虫变态期幼虫专性组织消亡的本质,有助于深入研究家蚕等昆虫变态发育的遗传调控机制,具有很高的科学价值。我们的实验首次获得了家蚕在蛹变态期丝腺组织自然发生细胞凋亡的 DNA 梯度电泳证据,证实了家蚕在变态发育过程中确实存在程序性细胞死亡的参与。用普通光镜观察发现,在家蚕幼虫吐丝第 1 天,由 2 列巨大丝腺细胞合包而成的丝腺组织就开始出现皱褶,至化蛹第 1 天皱褶愈加显著(图 2：a～d)。用透射电镜观察到在化蛹第 2 天由丝腺组织内膜与外膜包被的呈分枝状的丝腺细胞皱褶附近有许多大小不等呈圆球形的小体和呈溶解消失状态的裂解小颗粒(图 2：g～i),根据 Dai 和 Gilbert(1997)在烟草天蛾变态期前胸腺细胞中的相似观察结果,推测这些圆球小体就是凋亡小体,而且在化蛹第 2 天也同时检测到丝腺细胞出现特征性的 DNA 梯度电泳谱,表明此时大多数丝腺细胞已发生凋亡。

Dai 和 Gilbert(1997)认为烟草天蛾前胸腺细胞凋亡小体的消失是由于血细胞吞噬的结果。尽管家蚕的丝腺组织在化蛹第 1、2 天已呈现严重的萎缩皱褶状态,但是由于家蚕丝腺细胞巨大,此时仍然被组织外膜和内膜包被(图 2：a～f),所以在家蚕开放性循环系统的血淋巴中,血球细胞不可能通过丝腺组织外膜进入丝腺细胞内吞噬这些圆球小体(凋亡小体)。根据对家蚕丝腺观察到的圆球小体呈逐渐溶解消失的特征(图 2：h～i),推测它们的消亡更有可

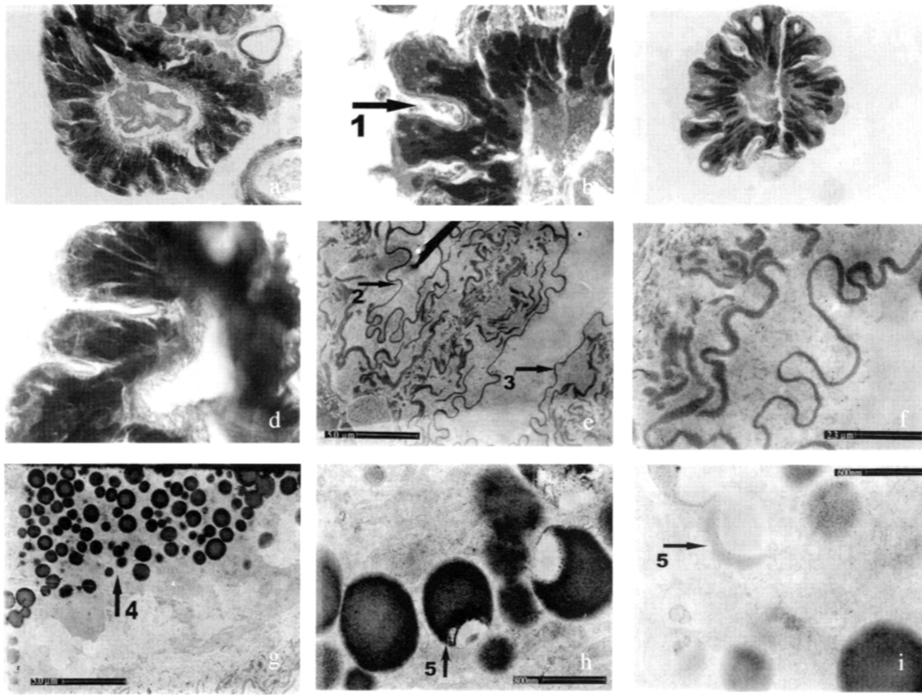


图 2　对家蚕化蛹第 1 天至第 2 天丝腺组织细胞皱褶和圆球小体(凋亡小体)的光镜和透射电镜观察

Fig. 2　The shrinkage cells and the circular bodies (apoptotic bodies) in the silk gland of silkworm pupae during the 1st day and the 2nd day after pupation under the LM and TEM

a, b: 化蛹第 1 天中部丝腺光镜观察，箭头 1 示丝腺细胞皱褶形态 Tissues section of the middle silk glands of pupae on the 1st day after pupation under LM (33 × , 165 ×). The arrowhead 1 showing plica of the silk gland cell; c, d: 化蛹第 1 天后部丝腺光镜观察 Tissues sections of the posterior silk glands of pupae on the 1st day after pupation under LM (33 × , 165 ×); e, f: 化蛹第 2 天中部丝腺电镜观察，箭头 2 示丝腺组织内包被膜，箭头 3 示丝腺组织外包被膜 The middle silk glands of pupae on the 2nd day after pupation under TEM (e: 标尺 Scale bar = 5.0 μm, 2 900 × ; f: 标尺 Scale bar = 2.3 μm, 6 800 ×). The arrowhead 2 showing silk gland interior envelope membrane, the arrowhead 3 showing silk gland exoteric envelope membrane; g ~ i: 化蛹第 2 天中部丝腺细胞发生的圆球小体(凋亡小体)电镜观察，箭头 4 示圆球小体，箭头 5 示正在裂解消失的圆球小体 The circular bodies (apoptotic bodies) in silk gland cells of pupae on the 2nd day after pupation under TEM (g: 标尺 Scale bar = 5.0 μm, 2 900 × ; h: 标尺 Scale bar = 800 nm, 18 500 × ; i: 标尺 Scale bar = 600 nm, 23 000 ×). The arrowhead 4 showing circular body, the arrowhead 5 showing the degenerating circular body.

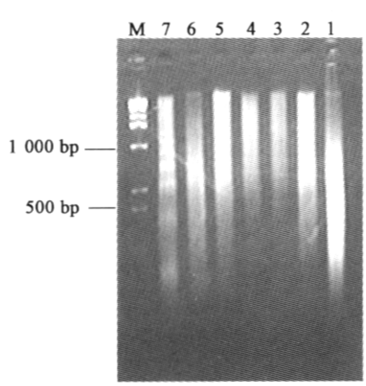


图 3　家蚕幼虫 5 龄后期至化蛹初期体内丝腺组织的 DNA 梯度电泳图

Fig. 3　DNA laddering electrophoresis of the silk gland of silkworm in different stages of the last instar to pupation

1 ~ 3: 5 龄第 6、7、8 天幼虫 Larvae on the 6th, 7th, 8th day of 5th instar; 4 ~ 5: 吐丝第 1、2 天幼虫 Larvae on the 1st, 2nd day of the spinning period; 6 ~ 7: 化蛹第 1、2 天 The 1st, 2nd day after pupation; M: 100 bp ladder.

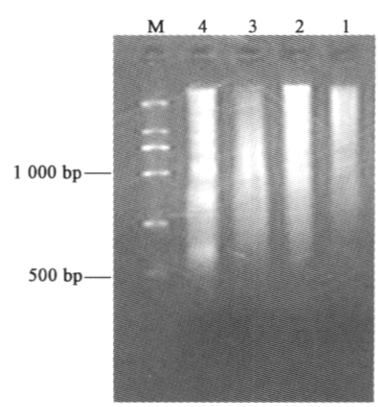


图 4　体外诱导培养和抑制处理的家蚕幼虫 5 龄第 6 天丝腺组织的 DNA 梯度电泳图

Fig. 4　Effects of 20-hydroxyecdysone and cycloheximide on changes in DNA laddering electrophoresis of the silk glands from larvae on day 6 of the last instar *in vitro*

1: 对照 CK; 2: 放线菌酮处理 Treated with cycloheximide; 3: 20-羟基蜕皮酮 + 放线菌酮处理 Treated with 20-hydroxyecdysone + cycloheximide; 4: 20-羟基蜕皮酮处理 Treated with 20-hydroxyecdysone; M: 100 bp ladder.

能是在程序性细胞死亡机制中被激活的半胱天冬酶(caspases)的酶促水解作用的结果。因此在家蚕的蛹变态期，丝腺组织的退化消亡极有可能是凋亡与水解两种机制共同作用的结果。采用昆虫蜕皮激素20-羟基蜕皮酮可使获得丝腺组织 DNA 梯度电泳证据的时序提前(图 4：4)，间接地证实了这一推测。

程序性细胞死亡存在于许多动物的变态发育过程中。20 世纪 90 年代后期至今，随着对线虫和哺乳动物细胞凋亡机制研究的深入，对果蝇等昆虫蜕皮激素诱导下发生细胞凋亡的遗传调控级联系统的研究也取得了重要进展，同时促进了对家蚕的相关研究。Sun 等(1994)检测到家蚕的 BmFTZ-F1 转录因子活性，Swevers 等(1995)和 Kamimura 等(1996)分别检测到家蚕体内的蜕皮激素受体 EcR-B1 的活性并分析了 *EcR* 基因的序列。Wu 等(1999)以家蚕丝腺为材料建立了 BAC 文库，并以此研究报道了家蚕细胞凋亡调控网络中的 BR-C 转录因子。2000 年以来，国外对家蚕细胞凋亡调控网络中各种转录因子基因的研究取得重要进展，通过各种分子生物学的研究方法，先后鉴定到在家蚕中存在的与果蝇细胞凋亡调控网络中相似的其他级联反应基因 *BmHR3* (Matsuoka and Fujiwara，2000；Eystathioy *et al*.，2001)、*E75* (Matsuoka and Fujiwara，2000；Swevers *et al*.，2002)、*BIAP* (Huang *et al*.，2001)、*E74* (Mita *et al*.，2003)、*BR-C* (Nishita and Takiya，2004；Ijiro *et al*.，2004；Reza *et al*.，2004)等和半胱天冬酶成员。在本实验结果的基础上，我们今后将对家蚕丝腺组织发生细胞凋亡的级联调控基因进行研究。

参 考 文 献 (References)

Dai JD，Gilbert LI，1997. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，1：69 – 78.

Dai JD，Gilbert LI，1999. An *in vitro* analysis of ecdysteroid cell death in the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res*.，297：319 – 327.

Eystathioy T，Swevers L，Iatrou K，2001. The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*：hormonal control，ovarian expression and functional properties. *Mech. Dev. May*.，103(1 – 2)：107 – 115.

Huang Q，Deveraux QL，Maeda S，Stennicke HR，Hammock BD，Reed JC，2001. Cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*，1 499(3)：191 – 198.

Ijiro TI，Urakawa H，Yasukochi Y，Takeda M，Fujiwara Y，2004. cDNA cloning，gene structure，and expression of Broad-Complex (BR-C) genes in the silkworm，*Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，34：963 – 969.

Kamimura M，Tomita S，Fujiwara H，1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm，*Bombyx mori*，and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*.，113(2)：341 – 347.

Lu MZ，Liu Y，Li QM，Wang YL，1998. The method for detecting apoptosis in histomorphology. *Jiangxi Journal of Medical Laboratory Sciences*，16 (2)：80 – 82.[路名芝，刘勇，李启明，王夷黎，1998. 细胞凋亡的组织形态学检测方法. 江西医学检验，16(2)：80 – 82]

Matsuoka T，Fujiwara H，2000. Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol*.，210(3)：120 – 128.

Mita K，Morimyo M，Okano K，Koike Y，Nohata J，Kawasaki H，Kadono-Okuda K，Yamamoto K，Suzuki MG，Shimada T，Goldsmith MR，Maeda S，2003. The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc. Natl. Acad. Sci*.，100(24)：14 121 – 14 126.

Nishita Y，Takiya S，2004. Structure and expression of the gene encoding a Broad-Complex homolog in the silkworm，*Bombyx mori*. *Gene*，339：161 – 172.

Pan YQ，Yu Y，Xia ZP，2001. The common methods for detecting apoptosis. *Progress in Veterinary Medicine*，22(2)：32 – 35.[潘耀谦，于艳，厦志平，2001. 检测细胞凋亡的常用方法. 动物医学进展，22(2)：32 – 35]

Peng LM，Wang ZL，2000. Clinic and Bases of Apoptosis. Beijing：People's Medical Publishing House. 153 – 206.[彭黎明，王曾礼，2000. 细胞凋亡的基础与临床. 北京：人民卫生出版社. 153 – 206]

Ress C，Holtmann M，Mass V，Sofsky J，Dorn A，2000. 20-hydroxyecdysone-induced differentiation and apoptosis in the *Drosophila* cell line，1(2)mbn. *Tissue Cell*，32(6)：464 – 477.

Reza AM，Kanamori Y，Shinoda T，Shimura S，Mita K，Nakahara Y，Kiuchi M，Kamimura M，2004. Hormonal control of a metamorphosis-specific transcriptional factor Broad-Complex in silkworm. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*.，139(4)：753 – 761.

Sambrook J，Fritsch EF，Maniatis T (Translated by Jin DY，Li MF，Hou YD)，1992. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 2nd. ed. Beijing：Science Press. 464 – 467.[J. 萨姆布鲁克，E. F. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁，黎孟枫，侯云德译)，1992. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京：科学出版社. 464 – 467]

Sun GC，Hirose S，Ueda H，1994. Intermittent expression of BmFTZ-F1，a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol*.，162(2)：426 – 437.

Swevers L，Drevet JR，Lunke MD，Iatrou K，1995. The silkmoth homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform)：cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，25(7)：857 – 866.

Swevers L，Eystathioy T，Iatrou K，2002. The orphan nuclear receptors BmE75A and BmE75C of the silkmoth *Bombyx mori*：hornmonal control and ovarian expression. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，32(12)：1 643 – 1 652.

Terashima J，Yasuhara N，Iwami M，Sakurai S，Sakurai S，2000. Programmed cell death triggered by insect steroid hormone，20-

hydroxyecdysone，in the anterior silk gland of the silkworm，*Bombyx mori*. *Dev*. *Genes*，210：545 – 558.

Truman JW，Schwartz LM，1982. Programmed death in the nervous system of a moth. *Trends Neurosci*.，5：270 – 273.

Tsuzuki S，Iwami M，Sakurai S，2001. Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis in the anterior silk gland of the silkworm，*Bombyx mori*. *Insect Biochem*. *Mol*. *Biol*.，31：321 – 331.

Wu C，Asakawa S，Shimizu N，Kawasaki S，Yasukochi Y，1999. Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm，*Bombyx mori*. *Mol*. *Gen*. *Genet*.，261(4 – 5)：698 – 706.

Zhang HW，Wang ZR，Zhang SC，2001. Development Biology. Beijing：Higher Education Press. 307 – 318. [张红卫，王子仁，张士璀，2001. 发育生物学. 北京：高等教育出版社. 307 – 318]

（责任编辑：黄玲巧）